

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局



(43) 国际公布日:
2005年8月18日(18.08.2005)

PCT

(10) 国际公布号:
WO 2005/075423 A1

- (51) 国际分类号⁷: C07D 211/74, 211/46, A61K 31/44
- (21) 国际申请号: PCT/CN2004/001125
- (22) 国际申请日: 2004年9月29日(29.09.2004)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
200410001071.X 2004年1月30日(30.01.2004) CN
- (71) 申请人(对除美国以外的所有指定国): 北京佗林医药科技有限公司(BEIJING TUOLIN MEDICINE SCIENCE AND TECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国北京市海淀区太平路46号1号楼102室, Beijing 100850 (CN)。海南洋浦新特药有限公司(HAINAN YANGPU NEW SPECIAL PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国海南省海口市国贸大道48号新达商务大厦2501房, Hainan 570125 (CN)。
- (72) 发明人;及
- (75) 发明人/申请人(仅对美国): 杨舜初(YANG, Jichu) [CN/CN]; 王楠(WANG, Nan) [CN/CN]; 杨兴(YANG, Xing) [CN/CN]; 任建平(REN, Jianping) [CN/CN]; 中国北京市海淀区太平路27号8号楼甲门102室, Beijing 100850 (CN)。

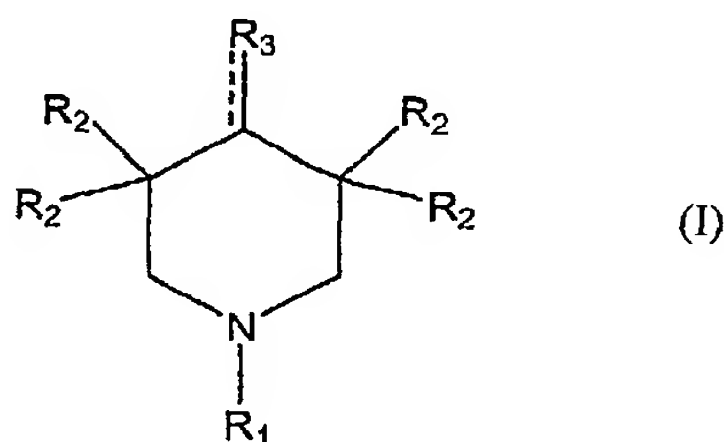
- (74) 代理人: 中国国际贸易促进委员会专利商标事务所 (CCPIT PATENT AND TRADEMARK LAW OFFICE); 中国北京市阜成门外大街2号万通新世界广场8层, Beijing 100037 (CN)。
- (81) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW
- (84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO(BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚专利(AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 欧洲专利(AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IT, LU, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

本国际公布:
— 包括国际检索报告。

所引用双字母代码和其它缩写符号, 请参考刊登在每期 PCT公报期刊起始的“代码及缩写符号简要说明”。

(54) Title: EXTRACTS OF MARASMIN ANDROSACEUS L.ES, PIPERDINONE DERIVATIVES AND THE USE AS ANTIHYPERTENSIVE AGENTS

(54) 发明名称: 安络小皮伞提取物, 哌啶酮衍生物及其制备抗高血压药物的用途



(57) Abstract: The present invention relates to extracts of Marasmins androsaceus L.es Fr, compounds of formula (I) or pharmaceutical acceptable e salts thereof, also to its preparation method, pharmaceutical compositions comprising them, use of said extracts or compounds for the manufacture of a medicament for the preventing and/or treating hypertension and related diseases.

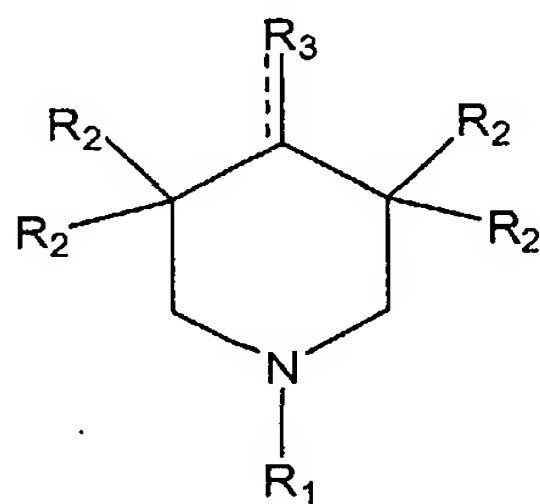
[见续页]

WO 2005/075423 A1



(57) 摘要

本发明涉及安络小皮伞提取物以及式 I 化合物或其药学上可接受的盐、它们的制备方法、含有它们的药物组合物以及所述提取物或化合物于制备预防和/或治疗与高血压及其相关病症的药物的用途。



I

安络小皮伞提取物，哌啶酮衍生物及其制备 抗高血压药物的用途

技术领域

本发明涉及安络小皮伞提取物，哌啶酮衍生物，其制备方法及其用于制备抗高血压药物的用途。

背景技术

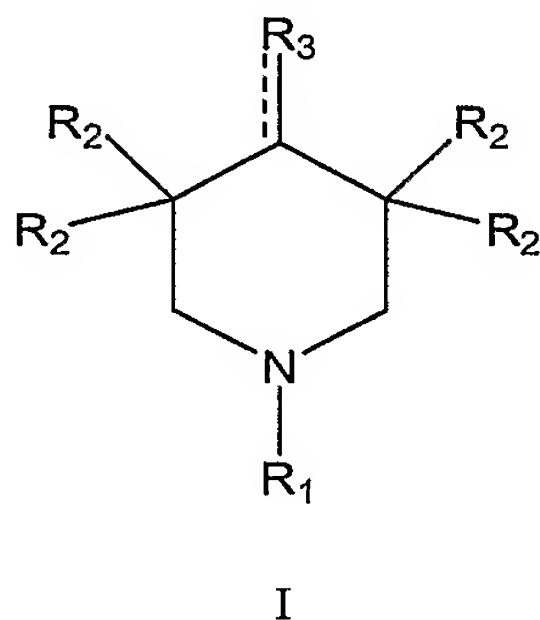
高血压及其相关病症是对人类健康和生命构成严重威胁的一大类疾病，其涉及的人口众多，近年来有呈低龄化的趋势。尽管人们已经开发出各种预防和治疗高血压的药物，但对开发新型疗效好的降压药仍然有着迫切、广泛的需求。

发明内容

本发明人经过研究发现，安络小皮伞提取物以及具有下式 I 的哌啶酮衍生物具有非常显著的降血压作用，因此可用于制备预防和/或治疗高血压及其相关病症的药物。

因此，本发明的第一个方面涉及安络小皮伞提取物，其特征在于其中含有 3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶酮，即下述式 II 化合物。

本发明的第二个方面涉及下式 I 化合物或其药学上可接受的盐：



其中，

R₁ 和各个 R₂ 相同或不同，各自独立地为氢原子或 C₁-C₅ 烷基；

.....代表单键或双键, 当.....为双键时, R_3 是氧原子, 当.....为单键时, R_3 是羟基。

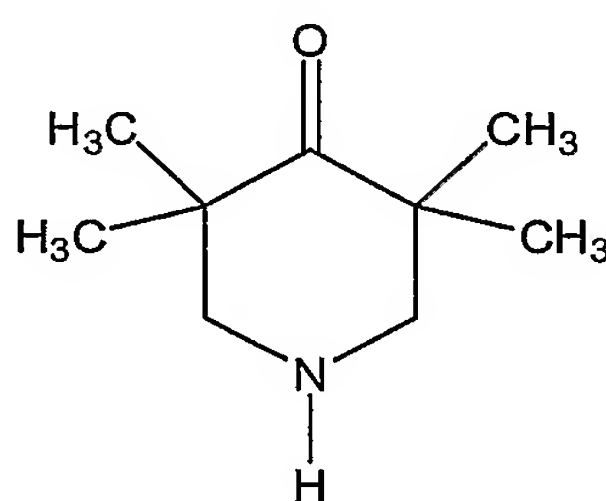
本发明的第三个方面涉及安络小皮伞提取物的制备方法, 该方法包括用有机溶剂、含水有机溶剂或水对真菌安络小皮伞菌丝体进行提取, 浓缩提取液后得到提取物。

本发明的第四个方面涉及制备上述式 I 化合物的方法, 该方法包括用有机溶剂、含水有机溶剂或水对例如真菌安络小皮伞菌丝体进行提取, 得到一种提取物, 分离、纯化, 得到下述式 II 化合物单体, 并使所得产物在碱性条件下与计算量的卤代烷反应, 对所述产物进行衍生化。

本发明的第五个方面涉及含有安络小皮伞提取物或者上述式 I 化合物或其药学上可接受的盐作为活性成分以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂的药物组合物。

本发明的第六个方面涉及安络小皮伞提取物或者式 I 化合物用于制备预防和/或治疗高血压及其相关病症的药物的用途。

根据本发明的一个优选实施方式, 式 I 化合物为其中 R_1 为氢, 各个 R_2 均为甲基,为双键且 R_3 为氧原子的化合物, 即下式 II 化合物:



II

安络小皮伞为白蘑科真菌安络小皮伞 (*Marasmius androsaceus* L. es Fr) 的干燥菌丝体。它是一种食用真菌, 又是一种常用的中药, 具有舒筋活络、止痛等作用。

根据本发明，安络小皮伞提取物可以根据以下方法制备：

真菌安络小皮伞 (*Marasmius androsaceus* L.es Fr) 菌种，从中国科学院微生物研究所购买，菌种号为：5.512。

a. 发酵培养方法：

培养基成分按照重量比为：麸皮 5%、葡萄糖 4%、玉米浆 0.4%、硫酸镁 0.05%、硫酸二氢钾 0.1。将斜面菌株挑入发酵培养基中置于 22-26℃ 的条件下，经过 7-8 天的培养，菌丝呈丝毛状，培养液呈淡黄色。pH=3.5-4.0 终止培养。

b. 将上述培养好的发酵液过滤得到菌丝体。

c. 将菌丝体用有机溶剂、含水的有机溶剂或水提取。将提取液过滤浓缩，即得到安络小皮伞提取物。

根据本发明，式 I 哌啶酮衍生物则可以如上所述，采用有机溶剂、含水有机溶剂或水对例如安络小皮伞的菌丝体进行提取，得到相应的提取物，经分离、纯化得到式 II 化合物单体后，再通过适当的衍生化来制备。

具体来说，在如上制备安络小皮伞提取物操作步骤 a-c 的基础上，接着进行以下步骤：

d. 将所得提取物在硅胶柱中进行色谱分离，以氯仿：甲醇=1%-100%进行梯度洗脱，收集 80%-90%氯仿部分，得到式 II 化合物的精制产物，在乙酸乙酯/甲醇中反复重结晶，得到式 II 化合物单体。

e. 将式 II 化合物溶解在 pH=8-12 碱性甲醇溶液中，加入计算量的卤代烷，在 40-60℃ 并搅拌条件下反应 10 小时，将得到的产物浓缩，反复重结晶，即可以得到式 I 化合物。

上述制备安络小皮伞提取物以及式 I 化合物方法中步骤 c 提取所用的有机溶剂可以是甲醇、乙醇、丙醇、丁醇等醇类；也可以是二氯甲烷、三氯甲烷、等卤代烷类，以及乙酸甲酯、乙酸乙酯、乙

酸丙酯等酯类，还可以是石油醚、乙醚等醚类。优选的溶剂是氯仿。

药理学研究表明，特征在于含有式 II 化合物的本发明提取物、其精制产物式 II 化合物单体以及式 II 化合物的衍生化产物式 I 化合物均具有非常明显的降低血压的作用，主要表现在：

a. 50-100mg/kg 的提取物在麻醉的高血压大鼠和猫模型上具有非常明显的降压效果。5-20mg/kg 的式 II 化合物在麻醉的大鼠和猫模型上具有非常明显的降压效果。3-50mg/kg 的式 I 化合物在麻醉的大鼠和猫模型上具有非常明显的降压效果。降压维持的时间均大于 4 小时。

b. 提取物、式 II 化合物和式 I 化合物均能抑制豚鼠回肠段的自动节律收缩，它们在浓度为 5×10^{-4} - 10×10^{-2} mg/ml 的范围内，均能缓慢地松弛平滑肌，至 3-5 分钟内完全松弛，其松弛的时间可以保持 4-5 小时（每间隔 15 分钟冲洗一次）。对照药异丙肾上腺素的浓度 5×10^{-5} mg/ml，冲洗后 20 分钟即恢复。

上述结果表明：提取物、式 II 化合物和式 I 化合物抑制回肠段的自动节律收缩的作用时间明显长于对照药异丙肾上腺素。

c. 提取物、式 II 化合物和式 I 化合物均对兔主动脉平滑肌有明显的抑制作用，它们在浓度为 5×10^{-4} - 10×10^{-2} mg/ml 的范围内，能够抑制肾上腺素引起的兔主动脉血管平滑肌的收缩，当浓度大于 5×10^{-5} mg/ml 时，则引起兔主动脉血管平滑肌的松弛。

上述研究结果表明：本发明提取物、式 II 化合物和式 I 化合物具有较好的松弛平滑肌作用、具有非常好的降血压作用，维持时间大于 4 小时。

因此，本发明安络小皮伞提取物以及式 I 化合物可以用于制备预防和/或治疗高血压及其相关病症的药物，所述的高血压及其相关病症包括单纯性高血压以及高血压引起的冠心病及其它心脑血管疾病。

根据本发明，本发明化合物的药学上可接受的盐包括其与无机或有机酸形成的酸加成盐或与碱形成的碱加成盐。其中酸加成盐包括但不限于：盐酸盐，氢溴酸盐，氢碘酸盐，硝酸盐，硫酸盐，硫酸氢盐，磷酸盐，磷酸氢盐，乙酸盐，丙酸盐，丁酸盐，三甲基乙酸盐，己二酸盐，藻酸盐，乳酸盐，柠檬酸盐，酒石酸盐，琥珀酸盐，马来酸盐，富马酸盐，苦味酸盐，天冬氨酸盐，葡萄糖酸盐，苯甲酸盐，甲磺酸盐，乙磺酸盐，苯磺酸盐，对甲苯磺酸盐和双羟萘酸盐；碱加成盐包括但不限于：铵盐，碱金属盐如钠和钾盐，碱土金属盐如钙和镁盐，有机碱盐如二环己胺和 N-甲基-D-葡萄糖胺盐，以及氨基酸盐如精氨酸和赖氨酸盐。

本发明安络小皮伞提取物或式 I 化合物可以单独使用，也可与药学上可接受的载体或赋形剂相混合，以药物组合物的形式使用。

本发明化合物的药物组合物可以以下面的任意方式施用：口服，喷雾吸入，直肠用药，鼻腔用药，颊部用药，局部用药，非肠道用药，如皮下，静脉，肌内，腹膜内，鞘内，心室内，胸骨内和颅内注射或输入，或借助一种外植储器用药。其中优选口服、注射或局部给药方式。

当口服用药时，本发明化合物可制成任意口服可接受的制剂形式，包括但不限于片剂、胶囊、水溶液或水悬浮液。其中，片剂使用的载体一般包括乳糖和玉米淀粉，另外也可加入润滑剂如硬脂酸镁。胶囊制剂使用的稀释剂一般包括乳糖和干燥玉米淀粉。水悬浮液制剂则通常是将活性成分与适宜的乳化剂和悬浮剂混合使用。如果需要，以上口服制剂形式中还可加入一些甜味剂、芳香剂或着色剂。

当局部用药时，特别是治疗局部外敷容易达到的患面或器官，如眼睛、皮肤或下肠道神经性疾病时，可根据不同的患面或器官将本发明化合物制成不同的局部用药制剂形式，具体说明如下：

当眼部局部施用，本发明式 I 化合物可配制成一种微粉化悬浮液或溶液的制剂形式，所使用载体为等渗的一定 pH 的无菌盐水，其中可加入也可不加防腐剂如氯化苄基乙醇盐。对于眼用，也可将化合物制成膏剂形式如凡士林膏。

当皮肤局部施用，本发明式 I 化合物可制成适当的软膏、洗剂或霜剂制剂形式，其中将活性成分悬浮或溶解于一种或多种载体中。软膏制剂可使用的载体包括但不限于：矿物油，液体凡士林，白凡士林，丙二醇，聚氧化乙烯，聚氧化丙烯，乳化蜡和水；洗剂或霜剂可使用的载体包括但不限于：矿物油，脱水山梨糖醇单硬脂酸酯，吐温 60，十六烷酯醋，十六碳烯芳醇，2-辛基十二烷醇，苄醇和水。

本发明式 I 化合物还可以无菌注射制剂形式用药，包括无菌注射水或油悬浮液或无菌注射溶液。其中，可使用的载体和溶剂包括水、林格氏溶液和等渗氯化钠溶液。另外，灭菌的非挥发油也可用作溶剂或悬浮介质，如单甘油酯或二甘油酯。

另外需要指出，本发明化合物的使用剂量和使用方法取决于诸多因素，包括患者的年龄、体重、性别、自然健康状况、营养状况、化合物的活性强度、服用时间、代谢速率、病症的严重程度以及诊治医师的主观判断。优选的使用剂量介于 0.01 ~ 100mg/kg 体重/天，其中最优剂量在 1mg/kg-50mg/kg 体重/天。

具体实施方式

下面的实施例，是对本发明的进一步详细说明，但不意味着对本发明的任何限制。

实施例 1

氯仿提取物的制备方法：

a. 真菌安络小皮伞 (*Marasmins androsaceus* L. es Fr) 的种子培养:

斜面培养基成分按重量比为: 麸皮 1-10、葡萄糖 0.3-3、蛋白胨 0.2-2、硫酸美 0.01-0.1、磷酸二氢钾 0.02-0.2、琼脂 0.5-5、水 100。将上述物质制成斜面, 将菌株移入斜面, 20-30℃的条件下, 经过 10-20 天的培养。

b. 真菌安络小皮伞 (*Marasmins androsaceus* L. es Fr) 的发酵培养:

培养基成分按照重量比为: 麸皮 3-30%、葡萄糖 1-10%、玉米浆 0.2-20%、硫酸镁 0.01-8%、硫酸二氢钾 0.05-9%。将斜面菌株挑入发酵培养基中置于 20-30℃的条件下, 经过 5-10 天的培养, 菌丝呈丝毛状, 培养液呈淡黄色。pH=1.5-6.0 终止培养。静置 5-10 天。

c. 将上述发酵好的培养液经过滤的菌丝体。将菌丝体 1000g 经过粉碎, 过 30-40 目筛, 3-5 倍的水提取 5 次, 低温减压回收提取液, 将残渣用 10% 的 NaOH 溶解, 再用 3-5 倍的氯仿提取 5 次, 回收氯仿, 即得到氯仿提取物 3g。

d. 氯仿提取物呈深褐色, 不溶于水, 易溶于氯仿、乙醇、丙酮等有机溶剂, 生物碱反应和硫酸苯酚呈现阳性。经过 TLC 检查, 展开剂氯仿: 甲醇: 氨水=9: 1: 0.1, 显示出 5 个斑点, 它们的 R_f 值分别是 0.12、0.23、0.45、0.56、0.71, 其中, R_f 为 0.56 的斑点处所含物质即为本发明式 II 化合物。

实施例 2

式 II 化合物 [3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶酮] 的制备方法:

将实施例 1 步骤 c 所得到的氯仿提取物进行硅胶柱层分离, 展开剂是氯仿: 甲醇: 氨水=9: 1: 0.1, 合并含有式 II 化合物的洗脱液, 浓缩后得到式 II 化合物单体。

式 II 化合物为白色针状结晶，熔点：54–57℃（分解）。

元素分析：C₉H₁₇N₀

实测值	C (%)	H (%)	O (%)
计算值	69.48	10.96	10.12
	69.68	10.97	10.32

MS (+FAB) m/z: 156.2, 149.2, 102.2, 98.2, 83.1, 74.0。证实其分子量为 155。

IR (KBr) cm⁻¹: 3318.93, 2910.09, 2755.81, 1727.93, 1626.67, 1726, 170, 1727.93, 1626.67, 1726.23, 2317.05, 2997–2465。

UV λ^{MeOH}_{MAX}nm: 264.3 (ε 13256)。

¹H-NMR (DMSO, TMS) δ ppm: 1.48 (s, 12H, (CH₃)₄), 2.63 (s, 4H, (CH₂)₂) 9.67 (s, 1H, NH)。

¹³C-NMR (DMSO-D₆, TMS) δ ppm: 27.20 (CH₃)₄, 49.79 (CH₂)₂, 59.09 (C), 204.35 (C=O)。

¹H-¹³C HMQC 和 ¹H-¹³C HMBC (远程相关) 及其归属的数据见表 1。

表 1. 400MHz 测定得到的式 II 化合物数据

C 位置	δ H (J in Hz ppm)	δ C (ppm)	HMQC	HMBC
1	9.67 (S, 1H, NH)			
2	2.63 (S, 2H, CH ₂)	59.09 (C)	与 2 位 H 相关	与 3' 位 H 相关
3		49.79 (CH ₂) ₂		与 3' 位 H 相关 与 2 位 H 相关
3'	1.48 (S, 6H, (CH ₃) ₂)	27.20 (CH ₃) ₂	与 3' 位 H 相关	与 3' 位 H 相关 与 2 位 H 相关
4		204.35 (C=O)		与 3' 位 H 相关 与 2 位 H 相关
5		49.79 (CH ₂) ₂		
5'	1.48 (S, 6H, (CH ₃) ₂)	27.20 (CH ₃) ₂		与 5' 位 H 相关 与 6 位 H 相关
6	2.63 (S, 2H, CH ₂)	59.09 (C)		与 5' 位 H 相关

实施例 3

1-乙基-3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶酮（式 Ia 化合物）的制备:

将实施例 2 得到的式 II 化合物 0.3g (1.94mmol) 与 7.5mmol 的溴代乙烷溶于 40ml 无水乙醇，加入配备有回流冷凝管、搅拌器、内部温度计和滴液漏斗的 100ml 三口烧瓶中。在搅拌下加入含 8.5mmol 乙醇钠的乙醇溶液，在 50℃ 的条件下反应 20-50 分钟。反应物冷却后滴加氯仿 20ml 静置，过滤除去溴化钠，滤液减压浓缩至干。反应产物进行硅胶柱层析，以氯仿：甲醇（5：1）洗脱，得到标题式 Ia 化合物：1-乙基-3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶酮。

FAB-MS 给出 m/z 185 [M+H]⁺，确定其分子量是 184。

实施例 4

3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶醇 (式 Ib 化合物) 的制备:

将实施例 2 得到的式 II 化合物 0.5g (3.22mmol) 用 50ml 氯仿溶解, 将溶液移入配备有回流冷凝管、搅拌器、内部温度计和三口烧瓶中, 加入等摩尔的硼氢化钠(NaHB_4), 在 50°C 的条件下反应 100-120 分钟。反应物过滤除去还原剂, 滤液减压浓缩至干。反应产物进行硅胶柱层析, 以氯仿: 甲醇 (5: 1) 洗脱, 得到标题式 Ib 化合物: 3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶醇。

FAB-MS 给出 m/z 158 $[\text{M}+\text{H}]^+$, 确定其分子量是 157。

实施例 5

式 II 化合物盐酸盐的制备: 取实施例 2 得到的式 II 化合物 1g (6.45mmol), 置于配备有回流冷凝管、搅拌器、内部温度计和滴液漏斗的 300ml 三口圆底烧瓶中, 加入 100ml 丙酮, 在搅拌、 80°C 的水浴中令其完全溶解, 慢慢滴加等摩尔量的 6N 盐酸溶液, 当滴加完全后, 静置 10 分钟, 回收丙酮溶液至干, 残渣用 30ml 氯仿溶液, 在过滤, 滤液中加入乙酸乙酯溶液 10ml。放置 5 小时, 过滤结晶, 得到式 II 化合物的盐酸盐: 3, 3, 5, 5-四甲基-4-哌啶酮盐酸盐。

实施例 6

氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ib 化合物对豚鼠回肠平滑肌的作用。

精密称取氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ib 化合物 0.5g 左右, 用蒸馏水溶解, 制成约 10mg/ml 的样品溶液。取豚鼠回肠部, 用预冷的台氏营养液 (1000ml 水, NaCl 8g, KCl 0.2g, MgCl_2 0.1g, NaH_2PO_4 0.05g, NaHCO_3 1g, CaCl_2 0.2g, 葡萄糖 1g, $\text{pH}=7.4$) 冲洗肠管中的食物残渣, 然后剪成 3cm 的长度, 两端用蛙心夹夹住, 置灌流槽中, 下端固定于槽的底部, 上端蛙心夹用线连接二道生理记录仪的拉力

换能器，回肠段的自动节律收缩被记录下来，浴槽中的台氏营养液恒温 35℃，通入纯氮，回肠段挂上取时加 1g 的拉力，平衡 40 分钟后开始，每 20min 换一次台氏营养液。先记录一段回肠正常收缩的曲线，以异丙肾上腺素为阳性对照药，然后加入不同浓度的氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ib 化合物，记录回肠的收缩曲线，结果见表 2。

表 2. 不同样品对豚鼠回肠平滑肌的作用

样品名称	浓度 (mg/ml)	起效时间 (分钟)	松弛时间 (小时)
异丙肾上腺素	5×10^{-5}	16	0.3
氯仿提取物	5×10^{-3}	3	5
式 II 化合物	1×10^{-4}	2	7
式 Ib 化合物	1×10^{-4}	3	5

试验结果表明：不同浓度的氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ib 化合物均能够抑制回肠段的自动节律收缩，氯仿提取物在最终浓度为 5×10^{-3} ，式 II 化合物和式 Ib 化合物在 1×10^{-4} 剂量范围内，均能够缓慢地松弛平滑肌，在 2-3 分钟时完全消失，其平滑肌的松弛可以持续 5-7 小时（每间隔 15 分钟冲洗一次）。阳性对照药异丙肾上腺素的浓度为 5×10^{-5} mg/ml，冲洗后 20 分钟即恢复。表明氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ib 化合物的作用时间比阳性对照长得多。

实施例 7

氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ia 化合物对兔主动脉条的作用。

新西兰打白兔一只，去头致昏，开胸，迅速取出其胸主动脉，放入与冷的 LOCK 氏液（1000ml 水，NaCl 9g，KCl 0.35g，MgSO₄·7H₂O 0.35g，KH₂PO₄ 0.16g，NaHCO₃ 1g）中，快速洗净血污，小心剪断血管外的结缔组织，与管径成 45 度角的宽 2-3mm 的主动脉条供试验用。

取 2cm 的主动脉条，两端用蛙心夹夹住置于恒温的 38℃ 灌流槽中，浴液中通入氧气，下端用蛙心夹固定于槽的底部，上端蛙心夹用线连接二道生理记录仪的拉力换能器，用生理记录仪记录血管条的收缩力，动脉条在灌流浴槽中平衡 80 分钟开始试验。其中，每间隔 20 分钟更换一次 LOCK 液，加入 1.2×10^{-6} mg/ml 肾上腺素，记录血管条的收缩曲线，待到收缩高度不再升高时，冲洗 4 次，40 分钟待血管条基线恢复后，加入不同浓度的氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ia 化合物作用 10 分钟，然后再加入浓度为 1.2×10^{-6} mg/ml 肾上腺素，可以观察到，此次加入的肾上腺素只能使血管条的收缩力量减少到原来的 $1/2 \sim 1/3$ ，结果见表 3。

表 3. 不同样品对兔主动脉条的作用

样品名称	浓度 (mg/ml)	起效时间 (分钟)	收缩力
异丙肾上腺素	1.2×10^{-6}	16	1
氯仿提取物	5×10^{-3}	3	0.5
式 II 化合物	1×10^{-4}	2	0.3
式 Ia 化合物	1×10^{-4}	3	0.3

本试验结果表明，氯仿提取物、式 II 化合物和式 Ia 化合物在浓度范围 $5 \times 10^{-3} \sim 1 \times 10^{-4}$ 时可以使肾上腺素对血管的收缩力明显降低。

实施例 8

氯仿提取物、式 II 化合物、式 II 化合物的盐酸盐以及式 Ib 化合物对大鼠的降血压作用。

自发性高血压大鼠 (SHR)，用 40mg/ml 戊巴比妥钠麻醉，背位固定于试验台上，剪去颈毛切开皮肤，分离右颈总动脉，近心端用动脉夹夹住，远心端用线结扎，用剪刀在远心端处剪 V 形小口，插入充满肝素生理盐水的动脉插管，将动脉插管与血压换能器连接，

将血压换能器连接到计算机控制的三通道生理药理记录系统，分离大鼠的右股静脉并插管，供注射药物用。待血压平稳后（即：血压收缩曲线平直后）开始静脉给药。其结果见表 4。

表 4. 氯仿提取物、式 II 化合物和式 I b 化合物对 SHR 大鼠的降血压作用

药物	剂量 (mg/kg)	血压 (mm/Hg)	给药前	给药后时间 (min)			
				5	60	120	240
氯仿提取物	200mg/kg		179 ± 10	145 ± 12*	124 ± 10**	125 ± 9.6**	162 ± 12**
		收缩压	129 ± 16	107 ± 13*	88 ± 1**	87 ± 13**	113 ± 10**
式 II 化合物	10mg/kg	舒张压	174 ± 11	141 ± 9.2*	120 ± 12	125 ± 14**	163 ± 12**
		收缩压	124 ± 12	105 ± 11*	84 ± 11**	83 ± 21**	110 ± 18**
式 II 化合物 的盐酸盐	10mg/kg	舒张压	170 ± 9.3	139 ± 19*	123 ± 11	129 ± 17**	169 ± 14**
		收缩压	119 ± 15	109 ± 13*	89 ± 12**	80 ± 23**	112 ± 16**
式 Ib 化合物	10mg/kg	舒张压	178 ± 13	140 ± 19*	121 ± 15**	126 ± 16**	162 ± 11**
		收缩压	125 ± 17	109 ± 1*	88 ± 10**	89 ± 8.9**	107 ± 9.2**
		舒张压					

*: P<0.05 与给药前比较。**: P < 0.01 与给药前比较。

本试验结果表明，氯仿提取物、式 II 化合物、式 II 化合物的盐酸盐以及式 Ib 化合物在 10-200mg/kg 的范围内均可以明显地降低高血压大鼠的收缩压和舒张压。

实施例 9

氯仿提取物、式 I 化合物和式 Ib 化合物对猫的降血压作用。取 2.5-3.2kg 的猫 5 只，按照实施例 8 的方法，分别经口服和静脉给药，测定收缩压和舒张压，正常猫不给药作为对照组，结果表明，它们均有非常显著的降压作用（见表 6-9）。

表 5. 对照组猫血压值

样品、时间	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4	动物 5	平均	标准差	T 值	P 值
	收缩压	收缩压	收缩压	收缩压	收缩压	收缩压			
	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)			
对照组									
药前值	168	212	200	182	184	189.2	17.06458		
药后 10 分	168	212	195	183	187	189	16.17096	0.985289	
药后 20 分	162	206	195	184	187	186.8	16.2696	0.825656	
药后 30 分	168	212	203	180	173	187.2	19.27952	0.866419	
药后 40 分	162	203	215	179	173	186.4	21.92715	0.827366	
药后 50 分	160	190	215	172	173	182	21.31901	0.571749	
药后 60 分	160	210	190	172	178	182	19.0263	0.546305	
	动物 1	动物 2	动物 3	动物 4	动物 5	平均	标准差	T 值	P 值
	舒张压	舒张压	舒张压	舒张压	舒张压	舒张压			
	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)	(mmHg)			
药前值	144	131	125	148	156	140.8	12.63725		
药后 10 分	136	136	125	150	156	140.6	12.36123	0.980437	
药后 20 分	137	136	125	150	153	140.2	11.38859	0.939077	
药后 30 分	133	120	125	148	156	136.4	15.24139	0.632606	
药后 40 分	133	120	125	153	160	138.2	17.51285	0.794587	
药后 50 分	135	120	120	153	155	136.6	17.03819	0.669695	
药后 60 分	136	124	120	148	160	137.6	16.63731	0.74081	

表 6. 氯仿提取物 (口服) 对猫的降压作用

样品、时间	动物 1 收缩压 (mmHg)	动物 2 收缩压 (mmHg)	动物 3 收缩压 (mmHg)	动物 4 收缩压 (mmHg)	平均 收缩压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
氯仿提取物								
100mg/kg								
o. s								
药前值	200	205	216	183	201	13.7356		0.300196
药后 10 分	193	190	206	176	191.25	12.31192	0.331138	0.825362
药后 20 分	173	207	190	161	182.75	20.07278	0.184113	0.74712
药后 30 分	143	181	176	153	163.25	18.19112	0.01616	0.099648
药后 40 分	129	162	170	132	148.25	20.79062	0.005477	0.032864
药后 50 分	127	162	171	133	148.25	21.53099	0.006141	0.051095
药后 60 分	126	161	176	135	149.5	23.07235	0.0086	0.053166
药后 90 分	127	175	183	136	155.25	27.86126	0.025759	
药后 120 分	145	175	184	146	162.5	19.97498	0.019165	
药后 150 分	188	183	186	171	182	7.615773	0.051897	
药后 180 分	196	201	206	179	195.5	11.73314	0.564903	
	动物 1 舒张压 (mmHg)	动物 2 舒张压 (mmHg)	动物 3 舒张压 (mmHg)	动物 4 舒张压 (mmHg)	平均 舒张压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
药前值	138	135	141	138	138	2.44949		0.679493
药后 10 分	130	140	157	130	139.25	12.73774	0.853524	0.876878
药后 20 分	115	140	137	125	129.25	11.5	0.187228	0.196542
药后 30 分	91	139	126	115	117.75	20.35313	0.095604	0.158499
药后 40 分	83	114	120	98	103.75	16.66083	0.006593	0.020113
药后 50 分	88	114	117	97	104	13.83233	0.002879	0.01765
药后 60 分	85	120	116	97	104.5	16.42153	0.006839	0.020448
药后 90 分	93	122	122	98	108.75	15.43535	0.009587	
药后 120 分	109	122	134	116	120.25	10.59481	0.01715	
药后 150 分	145	135	134	134	137	5.354126	0.74567	
药后 180 分	151	143	142	135	142.75	6.551081	0.223219	

表 7 式 II 化合物 (口服) 对猫的降压作用

样品、时间	动物 1 收缩压 (mmHg)	动物 2 收缩压 (mmHg)	动物 3 收缩压 (mmHg)	动物 4 收缩压 (mmHg)	平均 收缩压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
式 II 化合物								
10mg/kg								
o. s								
药前值	191	215	196	208	202.5	10.96966		0.221212
药后 10 分	190	180	159	136	166.25	23.9496	0.033194	0.131804
药后 20 分	170	181	138	123	153	27.06782	0.014681	0.052155
药后 30 分	154	140	138	130	140.5	9.983319	0.000159	0.00332
药后 40 分	146	133	143	140	140.5	5.567764	5.54E-05	0.004985
药后 50 分	149	140	144	144	144.25	3.685557	5.57E-05	0.010642
药后 60 分	149	153	130	144	144	10.03328	0.000223	0.008944
药后 90 分	154	180	154	140	157	16.69331	0.003868	
药后 120 分	146	195	163	156	165	21.18175	0.019962	
药后 150 分	146	206	168	157	169.25	26.09438	0.057113	
药后 180 分	158	213	170	164	176.25	24.985	0.102697	
药后 210 分	159	213	170	164	176.5	24.74537	0.103109	
药后 240 分	178	213	176	164	182.75	21.09305	0.147696	
	动物 1 舒张压 (mmHg)	动物 2 舒张压 (mmHg)	动物 3 舒张压 (mmHg)	动物 4 舒张压 (mmHg)	平均 舒张压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
药前值	143	165	145	137	147.5	12.15182		0.448148
药后 10 分	143	145	112	76	119	32.4037	0.150646	0.207389
药后 20 分	130	136	91	72	107.25	30.82613	0.051199	0.060186
药后 30 分	110	108	91	75	96	16.39105	0.002338	0.006499
药后 40 分	107	100	95	79	95.25	11.89888	0.000851	0.004198
药后 50 分	110	116	95	83	101	14.89966	0.00289	0.013399
药后 60 分	110	117	102	83	103	14.67424	0.003427	0.013881
药后 90 分	102	120	97	96	103.75	11.14675	0.001819	
药后 120 分	93	154	96	90	108.25	30.5982	0.054443	
药后 150 分	93	161	109	84	111.75	34.42262	0.097877	
药后 180 分	107	164	112	87	117.5	32.82783	0.137348	

表 8. 式 II 化合物（静脉给药）对猫的降压作用

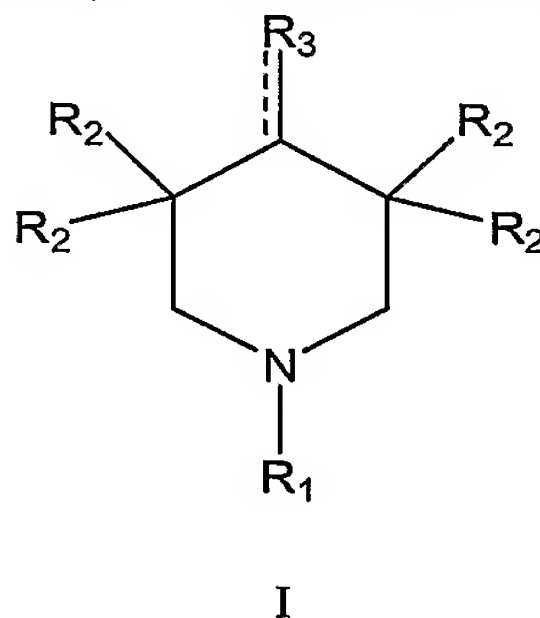
样品、时间	动物 1 收缩压 (mmHg)	动物 2 收缩压 (mmHg)	动物 3 收缩压 (mmHg)	动物 4 收缩压 (mmHg)	平均 收缩压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
式 II 化合物								
5mg/kg								
iv								
药前值	226	183	211	178	199.5	22.86919		0.462627
药后 10 分	100	110	182	150	135.5	37.78448	0.027401	0.023299
药后 20 分	111	126	172	150	139.75	26.83747	0.014691	0.013666
药后 30 分	119	137	173	136	141.25	22.72114	0.01118	0.013315
药后 40 分	134	137	172	135	144.5	18.37571	0.009515	0.01859
药后 50 分	156	147	171	135	152.25	15.17399	0.013747	0.051646
药后 60 分	174	142	174	142	158	18.47521	0.030228	0.098648
药后 90 分	170	167	178	143	164.5	15.06652	0.043138	
药后 120 分	182	167	202	147	174.5	23.27373	0.176318	
药后 150 分	186	170	202	150	177	22.2411	0.208039	
药后 180 分	187	176	212	165	185	20.11633	0.377789	
	动物 1 舒张压 (mmHg)	动物 2 舒张压 (mmHg)	动物 3 舒张压 (mmHg)	动物 4 舒张压 (mmHg)	平均 舒张压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
药前值	169	138	163	115	146.25	24.78407		0.679085
药后 10 分	84	93	146	101	106	27.556	0.072856	0.038731
药后 20 分	79	109	137	98	105.75	24.24012	0.058123	0.024881
药后 30 分	80	111	136	98	106.25	23.55667	0.057871	0.052244
药后 40 分	100	111	134	97	110.5	16.78293	0.054118	0.047452
药后 50 分	117	120	134	97	117	15.25341	0.091131	0.116098
药后 60 分	131	120	130	92	118.25	18.19112	0.118371	0.139775
药后 90 分	122	129	144	92	121.75	21.85368	0.188616	
药后 120 分	123	129	148	96	124	21.49419	0.223773	
药后 150 分	124	140	148	98	127.5	22.05297	0.301473	
药后 180 分	123	148	156	108	133.75	22.18671	0.480745	

表 9. 式 Ib 化合物 (口服)对猫的降压作用

样品、时间	动物 1 收缩压 (mmHg)	动物 2 收缩压 (mmHg)	动物 3 收缩压 (mmHg)	动物 4 收缩压 (mmHg)	平均 收缩压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
式 Ib 化合物								
10mg/kg								
o. s								
药前值	150	209	185	237	195.25	36.89964		0.170789
药后 10 分	136	139	145	147	141.75	5.123475	0.028345	0.566023
药后 20 分	146	125	153	136	140	12.19289	0.029435	0.52967
药后 30 分	146	126	154	136	140.5	12.15182	0.03041	0.515824
药后 40 分	140	126	154	136	139	11.6046	0.027038	0.322939
药后 50 分	136	130	150	130	136.5	9.433981	0.021523	0.056753
药后 60 分	140	122	152	138	138	12.32883	0.025844	0.000905
药后 90 分	135	130	156	146	141.75	11.61536	0.032596	
药后 120 分	146	131	165	164	151.5	16.21727	0.072973	
药后 150 分	145	139	166	171	155.25	15.6285	0.092893	
药后 180 分	152	142	160	180	158.5	16.11418	0.117733	
药后 210 分			156	186	171	21.2132	0.452377	
药后 240 分			155	202	178.5	33.23402	0.619755	
样品、时间	动物 1 舒张压 (mmHg)	动物 2 舒张压 (mmHg)	动物 3 舒张压 (mmHg)	动物 4 舒张压 (mmHg)	平均 舒张压 (mmHg)	标准差	T 值	P 值
药前值	134	156	116	154	140	18.8326		0.949541
药后 10 分	119	105	100	103	106.75	8.421203	0.018057	0.019637
药后 20 分	135	89	104	89	104.25	21.68525	0.047198	0.398951
药后 30 分	130	90	109	90	104.75	19.06786	0.039029	0.939613
药后 40 分	126	91	102	90	102.25	16.74067	0.024122	0.877248
药后 50 分	126	96	103	87	103	16.67333	0.02588	0.902185
药后 60 分	123	97	102	114	109	11.74734	0.031441	0.980271
药后 90 分	125	95	110	107	109.25	12.33896	0.034116	
药后 120 分	131	94	115	127	116.75	16.62077	0.113592	
药后 150 分	132	98	117	120	116.75	14.08013	0.09535	
药后 180 分	133	97	113	131	118.5	16.92139	0.14035	

权 利 要 求

1. 式 I 化合物或其药学上可接受的盐:

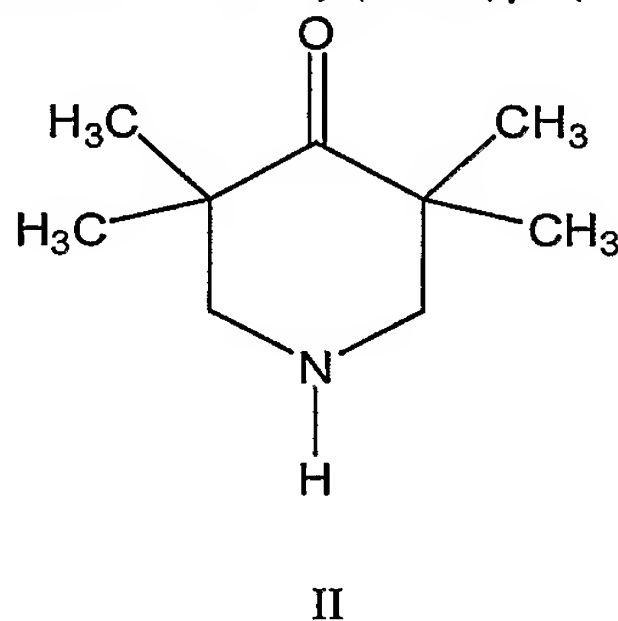


其中:

R_1 和各个 R_2 相同或不同, 各自独立地为氢原子或 C_1-C_5 烷基;

..... 表示单键或双键, 当 为双键时, R_3 是氧原子, 当 为单键时, R_3 是羟基。

2. 权利要求 1 的化合物, 其具有下式 II:



3. 安络小皮伞提取物, 其特征在于其中含有如权利要求 2 所述的式 II 化合物。
4. 药物组合物, 其含有权利要求 1 或 2 所述的化合物或权利要求 3 所述的安络小皮伞提取物以及一种或多种药学可接受的载体或赋形剂。
5. 权利要求 4 的药物组合物, 其以适于口服、注射或局部给药的剂型存在。

6. 制备安络小皮伞提取物的方法，该方法包括用有机溶剂、含水有机溶剂或水提取真菌安络小皮伞，并浓缩提取物。
7. 制备权利要求 1 所述的式 I 化合物的方法，该方法包括用有机溶剂、含水有机溶剂或水提取真菌安洛小皮伞，得到提取物，分离，纯化，得到式 II 化合物单体，并使所得产物在碱性条件下与计算量的卤代烷反应，对产物进行衍生化。
8. 权利要求 6 或 7 的方法，其中的有机溶剂为甲醇、乙醇、丙醇、丁醇、二氯甲烷、三氯甲烷、乙酸甲酯、乙酸乙酯、石油或乙醚。
9. 权利要求 1 或 2 所述的化合物或权利要求 3 所述的安络小皮伞提取物用于制备预防和/或治疗高血压及其相关病症的药物的用途。
10. 权利要求 9 的用途，其中所述的高血压及其相关病症为单纯性高血压、高血压引起的冠心病及其它心脑血管疾病。

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2004/001125

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

CO7D211/74, C07D211/46, A61K31/44

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC7: C07D211, A61K31/44

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

WPI,EPODOC,PAJ,CNKI,CA,CPRS (marasmins androsaceus l.es fr, piperdinone, piperidine, tetramethyl, C9H17NO)

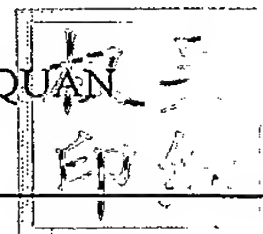
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN1261363A, LUNDBECK AS H, 26.July 2000, see claim 15	1
X	US5939436A, Merch Sharp & Dohme Ltd., 17.August 1999, see example 1	1
X	CN1363297A, Yang Mengjun, 14.August 2002, see example 1	6,8
A	CN1356982A, LILLY & CO ELI, 3.July 2002, see the whole document	1-10

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☒ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date	"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"L" document which may throw doubts on priority claim (S) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)	"&" document member of the same patent family
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means	
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed	

Date of the actual completion of the international search 22.March 2005	Date of mailing of the international search report 26 · MAY 2005 · 15 · 2005
Name and mailing address of the ISA/ 6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, 100088 Beijing, China Facsimile No. (86-10)62019451	Authorized officer WU HONGQUAN Telephone No. 86-10-62085611



INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2004/001125

CN	1261363	A	26-07-2000	MX	215088	B	07-07-2003
				WO	9851685	A1	19-11-1998
				ZA	9803726	A	27-01-1999
				AU	7206298	A	08-12-1998
				NO	9905457	A	08-11-1999
				EP	0983264	A1	08-03-2000
				CZ	9903960	A3	17-05-2000
				SK	9901527	A3	12-06-2000
				BR	9808740	A	03-10-2000
				NZ	500700	A	27-10-2000
				MX	9910191	A1	01-04-2000
				US	6335463	B1	01-01-2002
US	5939436	A	17-08-1999	WO	9621660	A1	18-07-1996
				AU	4312396	A	31-07-1996
CN	1363297	A	14-08-2002	None			
CN	1356982	A	03-07-2002	AU	770759	B2	01-03-2004
				WO	0100577	A2	04-01-2001
				AU	200054535	A	31-01-2001
				BR	200011996	A	05-03-2002
				NO	200106151	A	17-12-2001
				CZ	200104548	A3	17-04-2002
				EP	1196382	A2	17-04-2002
				SK	200101901	A3	04-06-2002
				KR	2002015068	A	27-02-2002
				HU	200201642	A2	30-09-2002
				US	6538136	B1	25-03-2003
				ZA	200109206	A	28-05-2003
				JP	2003522122T	T	22-07-2003
				MX	2001012727	A1	01-07-2003

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2004/001125

A. 主题的分类

CO7D211/74, C07D211/46, A61K31/44

按照国际专利分类表(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

IPC7: C07D211, A61K31/44

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))

WPI,EPODOC,PAJ,CNKI,CA,CPRS (安络小皮伞, 哌啶酮, 哌啶, 高血压, 白蘑科, 四甲基, C9H17NO)

C. 相关文件

类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	CN1261363A, H.隆德贝克有限公司, 2000 年 7 月 26 日公开, 参见权利要求 15	1
X	US5939436A, Merch Sharp & Dohme Ltd., 1999 年 8 月 17 日, 实施例 1	1
X	CN1363297A, 杨孟君, 2002 年 8 月 14 日公开, 参见实施例 1	6, 8
A	CN1356982A, 伊莱利利公司, 2002 年 7 月 3 日公开, 参见全文	1-10

☐ 其余文件在 C 栏的续页中列出。

☒ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型:

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件

“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性

“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期

22.3 月 2005(22.03.2005)

国际检索报告邮寄日期

26 · 5月 2005 (26 · 05 · 2005)

中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN)

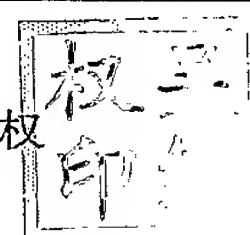
中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088

传真号: (86-10)62019451

受权官员

吴红权

电话号码: (86-10)62085611



国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2004/001125

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 1261363 A	26-07-2000	MX 215088 B WO 9851685 A1 ZA 9803726 A AU 7206298 A NO 9905457 A EP 0983264 A1 CZ 9903960 A3 SK 9901527 A3 BR 9808740 A NZ 500700 A MX 9910191 A1 US 6335463 B1	07-07-2003 19-11-1998 27-01-1999 08-12-1998 08-11-1999 08-03-2000 17-05-2000 12-06-2000 03-10-2000 27-10-2000 01-04-2000 01-01-2002
US 5939436 A	17-08-1999	WO 9621660 A1 AU 4312396 A	18-07-1996 31-07-1996
CN 1363297 A	14-08-2002	无	
CN 1356982 A	03-07-2002	AU 770759 B2 WO 0100577 A2 AU 200054535 A BR 200011996 A NO 200106151 A CZ 200104548 A3 EP 1196382 A2 SK 200101901 A3 KR 2002015068 A HU 200201642 A2 US 6538136 B1 ZA 200109206 A JP 2003522122T T MX 2001012727 A1	01-03-2004 04-01-2001 31-01-2001 05-03-2002 17-12-2001 17-04-2002 17-04-2002 04-06-2002 27-02-2002 30-09-2002 25-03-2003 28-05-2003 22-07-2003 01-07-2003